

08-894356

PCT/JP96/00348

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

27.03.96

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1995年 6月29日

REC'D 27 MAR 1996

出願番号  
Application Number:

平成 7年特許願第196915号

WIPO PCT

出願人  
Applicant(s):

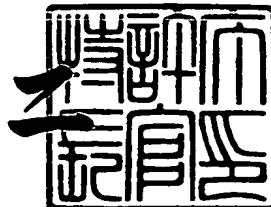
サントリー株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1996年 5月24日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

清川佑



出証番号 出証特平08-3032559

【書類名】 特許願  
【整理番号】 P95-0031  
【提出日】 平成 7年 6月29日  
【あて先】 特許庁長官 清川 佑二 殿  
【国際特許分類】 C12N 15/52  
【発明の名称】 アシル基転移酵素をコードする遺伝子  
【請求項の数】 11  
【発明者】  
【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー  
株式会社 基礎研究所内  
【氏名】 芦刈 俊彦  
【発明者】  
【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー  
株式会社 基礎研究所内  
【氏名】 田中 良和  
【発明者】  
【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー  
株式会社 基礎研究所内  
【氏名】 藤原 裕之  
【発明者】  
【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー  
株式会社 生物医学研究所内  
【氏名】 中尾 正宏  
【発明者】  
【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー  
株式会社 基礎研究所内  
【氏名】 福井 祐子  
【発明者】  
【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー

株式会社 基礎研究所内

【氏名】 米倉 圭子

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー  
株式会社 基礎研究所内

【氏名】 水谷 正子

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー  
株式会社 基礎研究所内

【氏名】 久住 高章

【特許出願人】

【識別番号】 000001904

【郵便番号】 530

【住所又は居所】 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

【氏名又は名称】 サントリー株式会社

【代表者】 鳥井 信一郎

【電話番号】 06-346-1131

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成 7年特許願第 67159号

【出願日】 平成 7年 2月17日

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アシル基転移酵素をコードする遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 芳香族アシル基転移酵素をコードする遺伝子。

【請求項 2】 配列番号 1において塩基配列番号 21～1412の塩基配列を有する請求項 1記載の遺伝子。

【請求項 3】 配列番号 1においてアミノ酸配列番号 5～468のアミノ酸配列を有する組換え芳香族アシル基転移酵素。

【請求項 4】 配列番号 2において塩基配列番号 38～1471の塩基配列を有する請求項 1記載の遺伝子。

【請求項 5】 配列番号 2においてアミノ酸配列番号 1～478のアミノ酸配列を有する組換え芳香族アシル基転移酵素。

【請求項 6】 植物体内外における色素のアシル化方法において、芳香族アシル基転移酵素をコードする遺伝子を、導入する植物において適当な発現ベクターに組み込み、当該植物に導入後、当該植物体内において目的色素のアシル化を行うことを特徴とする方法。

【請求項 7】 色素がアントシアニンである請求項 6記載の植物体内における色素のアシル化方法。

【請求項 8】 植物体内外における色素の安定化方法において、芳香族アシル基転移酵素をコードする遺伝子を、導入する植物において適当な発現ベクターに組み込み、当該植物に導入後、当該植物体内において目的色素のアシル化反応が行われることにより当該色素が安定化されることを特徴とする方法。

【請求項 9】 色素がアントシアニンである請求項 8記載の植物体内における色素の安定化方法。

【請求項 10】 植物の花色調節方法において、芳香族アシル基転移酵素をコードする遺伝子を、導入する植物において適当な発現ベクターに組み込み、当該植物に導入後、当該植物体内において目的色素のアシル化反応によって当該色素が安定化されることにより植物の花色を目的の花色に調節することを特徴とする方法。

【請求項 11】 色素がアントシアニンである請求項 10 記載の植物の花色調節方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、植物由来の芳香族アシル基転移酵素をコードする遺伝子及びその利用に関するものである。更に詳しくは、リンドウ (*Gentiana tri flora var. japonica*) 由来の芳香族アシル基転移酵素をコードする遺伝子及びその利用に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

花産業は新規かつ種々の品種を開発することに努力している。新規な品種の育成のための有効な方法の一つとして花の色を変えることがあり、古典的な育種方法を用いて、ほとんどの商業的品種について広範囲な色を作出することに成功している。しかしながら、この方法では種ごとで遺伝子プールが制限されていることから、単一の種が広範囲の種類の着色品種を有することは稀である。

【0003】

花の色は主として2つのタイプの色素、即ちフラボノイド及びカロチノイドに基づき、フラボノイドは黄色から赤ないし青色の範囲に寄与し、カロチノイドはオレンジ又は黄色の色調に寄与する。花色に主たる寄与をするフラボノイド分子はシアニジン、デルフィニジン、ペチュニジン、ペオニジン、マルビジン及びペラルゴニジンの配糖体であるアントシアンであり、異なるアントシアンが顕著な花の色の変化をもたらす。さらに花の色は無色のフラボノイドの補助発色、金属錯体形成、グリコシル化、アシル化、メチル化及び液胞のpHにより影響される (Forkmann, Plant Breeding 106:1, 1991)

【0004】

アシル化されたアントシアンは、シネラリア (*Senecio cruentus*) 由来のシネラリン (Goto et al., Tetrahedron

25:6021, 1984)、ツユクサ (Commelinacommunis) 由来のアオバニン (Goto and Kondo, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 30:17, 1991) 及びオヤマリンドウ (Gentiana Makinoi) 由来のゲンチオデルフィン (Yoshida et al., Tetrahedron 48:4313, 1992) を始め、自然界からの数多くの分離例が報告されている (タイマツバナ: Kondo et al., Tetrahedron 26:5879, 1985; シソ、パンジー: Goto et al., Tetrahedron 27:2413, 1987; シマフムラサキツユクサ: Idaka et al., Tetrahedron 28:1901, 1987; ヤマノイモ: Shoyama et al., Phytochemistry 29:2999, 1990; アカキャベツ、キキョウ、ロベリア、ラーカスパー、チョウマメ: Goto and Kondo, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 30:17, 1991; ニンジン: Glabgen et al., Phytochemistry 31:1593, 1992; アサガオ: Lu et al., Phytochemistry 32:659, 1992; キランソウ、トウバナ、オドリコソウ、ラベンダー、イヌハッカ、オオキセワタ、プレクトランサス、ウツボグサ、ヒゴロモソウ、ネジリイモ: Saito and Harborne, Phytochemistry 31:3009, 1992; オオオニバス: Strack et al., Phytochemistry 31:989, 1992; カンパニュラ: Brandt et al., 33:209, 1993)。  
。

## 【0005】

これらのアントシアノイドを修飾するアシル基は構造的に2種類に分けられる。一つはハイドロキシ桂皮酸を中心とする芳香族アシル基であり、もう一つはマロニル基のような脂肪族アシル基である。これらのアシル基転移反応のうち、グルコースを介して芳香族アシル基、好ましくはクマル酸やコーヒーアcidが結合したアントシアノイドはその吸収極大が長波長側に移動することがアサガオ (Pharbitis nil) のアントシアノイド系色素を用いた実験により観

察された (Dangle et al. *Phytochemistry* 34: 1119, 1993)。

## 【0006】

さらに、シネラリア (*Senecio cruentus*) 由来のシネラリンは1個の脂肪族アシル基と3個の芳香族アシル基を有するが、シネラリンからの芳香族アシル基の解離により、中性の水溶液中で色素の安定性が低下することが報告されている (Goto et al. *Tetrahedron* 25: 6021, 1984)。また、リンドウ (*Gentiana Makinoi*) に由来するゲンチオデルフィンはその分子内に存在する2つの芳香族アシル基により、サンドイッチ型の分子内スタッキングが起こり、水溶液中で色素が安定化されることが報告されている (Yoshida et al. *Tetrahedron* 48: 4313, 1992)。さらに、吉田らは、リンドウのアントシアニンにはアントシアニンの5位のグルコースと3'位のグルコースのそれぞれにアシル基が結合していることを明らかにした (*Tetrahedron* 48, P4313, (1992))。

## 【0007】

しかしながら、これらの研究は有機化学的側面から天然色素の構造学的研究においてなされており、アシル基を転移する酵素を単離するなどの生化学的側面からの研究はなされていない。

## 【0008】

また、植物におけるアントシアニン系色素へのアシル基転移酵素のうち、脂肪族アシルであるマロニル基転移酵素についてはパセリの培養細胞 (Matern et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 208: 233, 1981; Matern et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 226: 206, 1983; Matern et al., *Eur. J. Biochem.* 133: 439, 1983) や *Cicer arietinum* の実生 (Koster et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 234: 513, 1984) からのものを始めとして多くの報告が為されている。

## 【0009】

また、芳香族アシル基転移反応は 1980 年にナデシコ科の植物である *Silene* (Kamsteeg et al., Biochem. Physiol. Pflanzen 175: 403, 1980) で初めて示され、*Matioli* の可溶化酵素画分にも同様の芳香族アシル基転移酵素活性が見い出されている (Teutsch et al., Phytochemistry 26: 991, 1986)。

## 【0010】

しかしながら、これらの報告では酵素活性の存在を示したのみに留まっており、対応する酵素蛋白質を特定したり、その一次構造やさらにはそれをコードする遺伝子についてはなんら知見が得られていない。それ以外の芳香族アシル基転移酵素についても蛋白質や遺伝子の一次構造を明らかにした報告はなく、さらにこのアントシアニン系色素のアシル化反応を花色幅の拡大に積極的に利用して花を育種した例や、アシル化を用いてアントシアニンの安定化をはかった報告もない。

## 【0011】

一方、ペチュニア (*Petunia hybrida*) のアントシアニンの合成経路はよく研究されており (Wiering, H. and de Vlaming, P. Inheritance and biochemistry of Pigments. *Petunia*, P49-65, (1984)、Griesbach, R. J., asen, S. and Leonhardt, B. A., Phytochemistry vol. 30, P1729-1731, (1991) )、アシル基を含むアントシアニンが存在することが知られている。ペチュニアのアントシアニンのアシル基はクマル酸あるいはカフェ酸が知られており、アントシアニンの3位のルチノシドに一分子のクマル酸又はカフェ酸が結合していて、化学構造はアントシアニジンがマルビジンの場合、それぞれ  $3-O-(6-O-(4-O-\text{クマロイル})-\alpha-D-\text{グルコピラノシリル})-5-O-\beta-D-\text{グルコピラノシリル}-\text{マルビジン}$ 、 $3-O-(6-O-(4-O-\text{カフェオイル})-\alpha-D-\text{グルコピラノシリル})-5-O-\beta-D-\text{グルコピラノシリル}-\text{マルビジン}$  であるとされていた。しかし、アシル基を2つ持つアントシアニンにつ

いての報告例はなかった。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、植物由来の芳香族アシル基転移酵素をコードする遺伝子及びその利用に関するものである。即ち、当該利用に関しては、植物において、フラボノイド、好ましくはアントシアニンへのアシル基転移反応を制御する方法が挙げられ、それにより單一種が広範囲の花色を発現する可能性を提供する。特に、芳香族アシル基の転移により、アントシアニンの吸収極大が長波長側に移動することから、既存の花色に青味を持たす場合に有効であると考えられる。

【0013】

これらの技術を実現化させるためには芳香族アシル基転移反応をつかさどる酵素を明らかにし、その酵素をコードする cDNA を分離する必要がある。更に、一つのアシル基転移酵素の cDNA から遺伝子の相同性を利用して他のアシル基転移酵素遺伝子の分離が可能となる。また、アシル化によりアントシアニンの安定性が増すことから、安定なアントシアニン色素の生産も可能となる。

【0014】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、リンドウの花弁からアシル基転移酵素を精製し、その一次構造を決定した。更には、遺伝子組換え技術を用いてリンドウのアシル基転移酵素の cDNA を単離し、構造遺伝子の塩基配列を決定した。即ち、本発明はリンドウの花弁に存在するアシル基転移酵素をコードしている DNA 配列を提供するものである。また、本発明に係る酵素を用いてアントシアニン系色素をアシル化することにより花色を変化させることができ、アントシアニンの安定性を増すことができる。

【0015】

アシル基転移酵素をコードする遺伝子は例えば次のようにして得ることが出来る。即ち、まず、リンドウの花弁よりアシル基転移酵素を精製する。従来、本発明が成される以前に、芳香族アシル基転移酵素の精製に成功した例はなく、本発明者らは各種のクロマトグラフィー法、特にブルーセファロース樹脂及び類似の

樹脂を用いたアフニティーコロマトグラフィー法を行うことにより初めて当該酵素の精製に成功した。

次に、常法に従ってアシル基転移酵素の部分アミノ酸配列を解明し、それらのアミノ酸配列に対応する合成ヌクレオチドを作製する。

【0016】

一方、同じリンドウの花弁より poly A + RNA を抽出し、常法により、2本鎖 cDNA を合成し、更に cDNA ライブライマーを作製する。前述の2本鎖 cDNA を鋳型にし、前述の合成 DNA と cDNA を合成する際に使用した合成 DNA プライマーを用い、PCR 法により、アシル基転移酵素遺伝子に特異的な DNA 断片を取得する。次に、この DNA 断片をプローブにして、前述の cDNA ライブライマーをスクリーニングし、陽性クローンを得る。そして、このクローンから回収されるプラスミド DNA を分離し、DNA 塩基配列を決定する。更に精製したアシル基転移酵素の分析により得られたアミノ酸配列と DNA 塩基配列から推定したアシル基転移酵素のアミノ酸配列とを比較することにより、陽性クローンが求める cDNA クローンであることを確認する。

【0017】

また、このクローンを大腸菌及び酵母での遺伝子発現系を用いて発現させ、酵素活性を測定することにより、得られた遺伝子がアシル基転移酵素をコードしていることを確認し、アシル基転移酵素遺伝子の翻訳領域を明らかにすることにより本発明に係るアシル基転移酵素をコードする遺伝子が得られ、更に、当該遺伝子を発現させることにより遺伝子産物である目的のアシル基転移酵素蛋白を得ることができる。

【0018】

また、本発明者らは、ペチュニア品種サフィニアパープル（サントリー（株））の花色が通常の赤紫から紫に変化した変異株（VM）を見いだし、アントシアニンの構造決定を、例えば吉田らの文献（Yoshida et al., Tetrahedron 48; 4313, 1992）に記載の方法に従って行った。

【0019】

なお、本明細書においては主にリンドウ由来のアシル基転移酵素について述べ

ているが、当該酵素の精製法をそのまま又は一部を改変して、他の植物のアシル基転移酵素を精製し、当該酵素に係るアミノ酸配列を決定することにより、当該酵素をコードする遺伝子をクローニングすることができる。更に、本発明に係るリンドウ由来のアシル基転移酵素のcDNAをプローブとして用いれば、他の植物の類似のアシル基転移酵素のcDNA又は染色体DNAクローンを得ることが可能である。

## 【0020】

また、本明細書において示したように、リンドウ由来のアシル基転移酵素を精製し、常法に従って当該酵素に対する抗体を得ることにより、その抗体と反応する蛋白質を作るcDNA又は染色体DNAをクローニングすることができる。従って、本発明はリンドウ由来のアシル基転移酵素の遺伝子のみに限定されるものではなく、広く芳香族アシル基転移酵素に関するものである。

## 【0021】

また、本明細書においてはアントシアニンを含むフラボノイドのアシル基転移反応において、アシル基の供与体としてp-クマロイル-CoA又はカフェオイル-CoA等のCoAエステルを挙げたが、p-クマロイル、フェルロイル又はシナポイル-1-O-グルコースといったハイドロキシシンナモイル-1-O-グルコースも芳香族アシル基の供与体としての利用が可能である（Glass and Seitz, Planta 186: 582, 1992）、本発明に係る酵素を用いた利用が可能である。

## 【0022】

## 【実施例】

以下に本発明を実施例に基づいて詳細に説明する。実験の手順は特に記述しない限りSambrookらのMolecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に従った。

実施例1 植物からのアシル基転移酵素の検索

## (1) 基質の調製

デルフィニジン3、5-ジグルコシドおよびシアニジン3、5-ジグルコシド

はバーベナ (*Verbena hybrida*) の一品種であるタピアンバイオレット (サントリー (株) より購入可能) の花弁からそれぞれのジアセチル体を抽出し、脱アセチル化することにより取得した。タピアンバイオレットの花弁 (348 g) を液体窒素とともにホモジナイザーで摩碎し、50% (v/v) アセトニトリル、0.2% トリフルオロ酢酸 (TFA) 溶液 1.5 L に浸して 3 日間放置した。

## 【0023】

濾紙上にケイソウ土 (#100) を敷き詰めて吸引ろ過し、ロータリーエバポレーターで約半分量に濃縮して、HP-20 にアプライした。800 ml の蒸留水で洗浄後、50% アセトニトリル、0.1% TFA 800 ml で色素画分を溶出した。エバポレーターで濃縮後、凍結乾燥して、粗色素 (7.3 g) を得た。

## 【0024】

タピアンの主色素はデルフィニジン及びシアニジンの 3、5-ジアセチルグルコシドであるため、以下の脱アセチル化操作を行った。粗色素 1 g をメタノール 50 ml に溶解し、窒素ガスを 15 分間通気して溶存酸素を除いた後、氷冷した。

## 【0025】

一方で、1 N 水酸化ナトリウム 50 ml から同様に溶存酸素を除き、氷冷下で先の色素溶液に攪拌しながら滴下し、更に 30 分間攪拌して加水分解反応をさせた。6 N 塩酸 1 ml を加えて反応を停止させ、蒸留水 5 ml を加えてエバポレーターで約半量に濃縮し、終濃度 10% になるようにメタノールを加えて 2 ml ずつ Sep-Pac C18 カラム (ウォーターズ アソシエーション社) にアプライし、蒸留水 5 ml で洗浄した後、30% アセトニトリル、0.6% TFA 2 ml で溶出させた。

## 【0026】

溶出液をすべて集めてエバポレーターで濃縮し、HPLC による分取を行った。DEVELOSIL ODS-10/20 (50 × 300 mm; 野村化学 (株)) カラムを用い、120 分間で TFA が 0.1% から 0.3%、アセトニトリ

ルが10%から30%の直線濃度勾配によって溶出させた。毎分32mlの流速で0.5分毎に分取し、各画分の色素画分の吸収スペクトルを測定して、デルフィニジン3、5-シグルコシドおよびシアニジン3、5-シグルコシドを分離してそれを濃縮、凍結乾燥した（デルフィニジン3、5-ジグルコシド 75mg、シアニジン3、5-ジグルコシド 50mg）。各々を1.5mg/mlになるように0.5%TFAに溶解して、使用するまで-80℃に保存した。

## 【0027】

もう一方の基質であるヒドロキシシンナモイル-CoAの合成は以下の方法を行った。最初に、文献（Stockigt and Zenk, Z. Naturforsch. 30:352, 1975）に従ってカフェ酸（ナカライトスク社）とN-ヒドロキシスクシンイミド（メルク（Merck）社）よりエステルを合成した。このエステル0.5mmolを2mlのアセトンに溶解し、一方でコエンザイムA（CoA:KOHJIN）0.1mmolと炭酸水素ナトリウム1mmolとを20mlの水に溶解して、これに先のエステル溶液を1滴ずつ加えた。

## 【0028】

攪拌しながら窒素ガスの下で室温で一晩反応させた後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、遠心（27000×g、10分）によって不溶物を除いて、HPLCで目的の生成物を分取した。DEVELOSIL ODS-10/20 (50×300mm; 野村化学（株）) カラムを用い、0.1%TFA存在下でアセトニトリルが40分間で18%から36%の直線濃度勾配によって溶出させた。毎分32mlの流速で0.8分毎に分取し、各画分の吸光スペクトル（200～400nm）を調べて344～348nmに極大吸収を持つ画分をカフェオイルCoA画分として集めた。それらをロータリーエバポレーターで濃縮した後、同じカラムで再び分離した。

## 【0029】

但し、アセトニトリル18%、TFA 0.1%の等濃度クロマトグラフィーで分離を行い、同様に吸光スペクトルを調べて、目的の化合物を含む画分をロータリーエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥した。この方法で35mmolの生成物

が得られた。また、上記の方法中カフェ酸のかわりにクマル酸を用いることによりp-クマロイル-CoAが合成でき2mg/mlになるように蒸留水に溶解して、使用するまで-80℃に保存した。

## 【0030】

## (2) 粗酵素液の抽出方法

酵素を抽出する植物組織（花弁や食用部分等）3gを液体窒素で凍結させて乳鉢上で磨碎した。10mlの抽出用緩衝液（100mMリン酸緩衝液（pH7.5）、10mMアスコルビン酸ナトリウム、14mM2-メルカプトエタノール）を加えて更に磨碎し、ガーゼ3層で濾過した。DOWEX（1-X2、100-200mesh；室町化学工業（株））3gを添加して10分間攪拌した後に吸引ろ過によって樹脂を除去し、遠心分離（27000×g、20分）によって植物体残査を除いた。70%飽和硫酸で塩析を行い、タンパク質を沈殿させた。沈殿を1mlの溶解用緩衝液（20mMリン酸緩衝液（pH7.5）、14mM2-メルカプトエタノール）に懸濁し、遠心分離（27000×g、5分）によって不溶物を除去した後、溶解用緩衝液で平衡化させたSephadex G-25カラム（NAP-10；ファルマシア社）を用いて脱塩した溶液を粗酵素液として用いた。

## 【0031】

## (3) 酵素活性の測定方法

100mM リン酸緩衝液（pH8.5）、デルフィニジン3、5-ジグルコシド 24nmol、カフェオイル-CoA 21.5nmol、及び酵素液20μlを含む反応液50μlを30℃で10分間反応させた。13.8%（v/v）酢酸を含むアセトニトリル50μlを加えて反応を停止させ、遠心分離（18000×g、5分）によって不溶物を除いた後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で分析した。分析はC18逆相カラム（YMC-Pack ODS-A、6.0×150mm；ワイエムシイ社）を用い、21.6%アセトニトリル、0.1%トリフルオロ酢酸を毎分1mlの流速で流し、反応液20μlを分析した。化合物の検出には三次元クロマトグラフィーシステム（CLASS-LC10；（株）島津製作所）を使用し、生成物は300nm付近に極大吸収をも

つこと、及び極大吸収が約4 nm長波長側に移動していることからアシル基（カフェ酸）が結合し、デルフィニジン3-グルコシル5-カフェオイルグルコシドが生成していることを確認した。

## 【0032】

520 nmの波長で検出し、基質（デルフィニジン3、5-ジグルコシド）と生成物（デルフィニジン3-グルコシル5-カフェオイルグルコシド）とのピーク面積の和に対する生成物のピーク面積の比を求め、生成物のモル数を計算して酵素活性（k<sub>at</sub>）とした。このHPLC分析における各化合物の展開時間は次の通りである。カフェオイル-CoA: 6.3分、デルフィニジン3、5-ジグルコシド: 3.3分、デルフィニジン3-グルコシル5-カフェオイルグルコシド: 5.3分。

## 【0033】

但し、この反応条件下においては反応液中のデルフィニジン3、5-ジグルコシドがアシル基転移酵素により、カフェ酸で修飾されることにより、反応液の色が濃青色から赤紫色に変化するため、簡便な方法として、マイクロタイタープレート中に反応を行い、色の変化によって酵素活性を調べることができる。

なお、反応後のプレートを室温で長期間（1日～1週間）放置すると、アシル化されていないデルフィニジン3、5-ジグルコシドは無色化するのに対して、酵素の働きによってアシル化されたデルフィニジン3、5-ジグルコシドでは赤紫色が残ることから、デルフィニジン3、5-シグルコシドがアシル化されることによって中性からアルカリ性の水溶液中での安定化が認められた。同様にシアニジン3、5-ジグルコシドを基質とした場合も反応液の色が赤紫色から濃青色に変化し、色素が安定化することから、簡易的酵素アッセイ方法での酵素活性の検出が可能である。

## 【0034】

一方、カフェオイル-CoAのかわりにp-クマロイル-CoAを基質とした場合もアシル化による色の変化及びアントシアニンの安定化が認められるが、色調の変化の度合いはカフェオイル-CoAの場合に比べ少ない。

## 【0035】

## (4) アシル基転移酵素の検索

各種の植物（リンドウ、アイリス、デルフィニウム、ストック、トルコキキョウ、ナデシコ、スイートピー、ラーカスパー、パンジー（以上、花弁）、赤キヤベツ、赤タマネギ、金時ニンジン、西洋ニンジン、ムラサキイモ（以上、食用部分）及びナス（果実上皮部分））から上記の方法によって粗酵素液を抽出し、酵素活性を測定したところ、トルコキキョウ、ナデシコ及び、リンドウに各々 0.63、0.0012及び 21.8 nkat/mg 蛋白質のアシル基転移活性が認められた。抽出タンパク質当たりのアシル基転移酵素活性が最も高いリンドウを酵素精製の材料として用いることにした。

なお、タンパク質濃度の定量には Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad 社) を用いた。

## 【0036】

実施例2 アシル基転移酵素（1）の精製

## (1) 酵素の精製

エゾリンドウ (*Gentiana triflora* var. *japonica*) の花弁から酵素の精製を行った。以下の実験は記載がない限り、0~4°C で行った。エゾリンドウの花弁 3 kg を液体窒素存在下でエクセル・オート・ホモジナイザー (DX-3; 日本精機製作所) を用い磨碎した。8 L の抽出用緩衝液 (100 mM トリス塩酸 (pH 7.0)、10 mM アスコルビン酸ナトリウム、10 mM p-（アミジノフェニル）フッ化メタンスルフォニル塩酸塩 (p-APMSF; 和光純薬工業 (株))、5 mM ジチオスレイトール (DTT; ナカライトスク社) ) とポリクラール SB-100 (和光純薬工業 (株)) 500 g を加えてポリトロンで完全に粉碎した。

## 【0037】

粉碎液をガーゼ 4 層で搾ったのち、さらに遠心分離 (11000 × g、30 分) して細胞残渣を除去した。40% 飽和硫酸で塩析を行い、不溶物を除去した後に 70% 飽和硫酸で再び塩析を行った。沈殿を 250 ml の溶解用緩衝液 (20 mM トリス塩酸 (pH 7.0)、10 mM p-APMSF、1 mM DTT) に懸濁し、遠心分離によって不溶物を除去した後、同緩衝液で平衡化させた Se

phadex G-25 (95×110mm; ファルマシア社) のカラムを用いて脱塩した。蛋白質を含む画分を集め (860ml) 、以下のクロマトグラフィーに供した。

なお、Q-Sephadex Fast Flow, HiTrap Blue 及び Phenyl Superose の各クロマトグラフィーは室温で FPLC システム (ファルマシア社) を用いて行った。

#### 【0038】

まず、溶解用緩衝液で平衡化させた Q-Sephadex Fast Flow (26×100mm; ファルマシア社) にアプライし、同じ緩衝液で十分に洗浄した後、塩化ナトリウム濃度を 60 分間で 0M から 0.4M に変化させる直線勾配により溶出させた (8ml/min)。酵素活性のある画分を集めた (130ml) 後、アフィニティクロマトグラフィーを行った。溶解用緩衝液で平衡化させた HiTrap Blue (5ml, 16×25mm; ファルマシア社) を 3 本直列に繋いだカラムにアプライし、同緩衝液で十分に洗浄した後、1M 塩化サトリウムを含む同緩衝液で溶出させた。活性画分を 70% 飽和の硫安で塩析し、蛋白質の沈殿を得た。

#### 【0039】

この沈殿物を 1ml の溶解用緩衝液に懸濁して遠心分離によって不溶物を除いた後、溶解用緩衝液で平衡化させた Sephacryl S-200 (25×1150mm; ファルマシア社) にアプライした。毎分 0.2ml の流速で、約 3ml ずつ分取し、再び活性画分を集めて (27ml) 、1M になるように硫安を加えた。十分に攪拌した後、遠心分離 (39000×g, 10 分) により不溶物を除去し、1M 硫安を含む溶解用緩衝液で平衡化させた Phenyl Superose 5/5 (5.0×50mm; ファルマシア社) にアプライした。

#### 【0040】

毎分 0.5ml の流速で、十分に洗浄した後、硫安濃度を 60 分間で 1M から 0M に直線的に下げるにより蛋白質を流出させた。0.5ml ずつ分取した各画分の酵素活性を測定し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (10% アクリルアミドゲル; 第一化学 (株) ) で分析した結果、ほぼ単一の蛋白質とし

て分子量約50,000のバンドが認められ、且つこの蛋白量と活性との相関が認められることから、この蛋白質が目的のアシル基転移酵素であると断定した。更に单一標品を得るために活性を持つ画分(12ml)を逆相HPLCにより精製した。

#### 【0041】

カラムはDEVELOSIL 300C4-HG-5(4.6×250mm; 野村化学(株))を用い、毎分1mlの流速で、トリフルオロ酢酸0.1%存在下、30分でアセトニトリル濃度を40.5%から56.7%の直線濃度勾配で変化させることにより溶出させた。280nmの吸収をモニターしながら1mlずつ分画し、さらに各画分をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析して分子量約50,000の蛋白質を含む画分を集めた。このHPLC操作を30回繰り返し、スピードバック(サバント社)で濃縮することにより約0.2mgの单一蛋白質標品を得ることができた。

#### 【0042】

##### (2) 精製蛋白質の分析

500pmolの精製標品をアミノ酸シーケンサー(PSQ-1; (株)島津製作所)に供したところ、エドマン分解の第一段目で200pmolのグルタミン酸、更に第2段でも90pmolのグルタミン酸が検出されたが、三段目以降は判読不能であったため、本酵素のN末端は何らかの形でブロックされていると考えられた。

#### 【0043】

しかしながら、N末端がグルタミン酸である場合にはピログルタミル基が生じ、エドマン分解によるシーケンスでは上述のような結果を示すことが知られていることから本酵素のN末端はグルタミン酸である可能性が高い。

#### 【0044】

残りの沈殿を80μlの45mMトリス塩酸(pH8.5)、3.6M尿素、0.09% SDSを含む溶液に溶解し、リシリエンドペプチダーゼ(Lysyl Endopeptidase: *Achromobacter lyticus*由来; 和光純薬工業(株))16pmolを加えて、37℃で6時間反応させた。

反応液をそのまま D E V E L O S I L 300C4-HG-5 カラムで分離した。

【0045】

分離条件は、0.1%トリフルオロ酢酸のもと、70分でアセトニトリル濃度が0%から80%の直線濃度勾配、毎分0.7mlの流速で、210nmの吸収をモニターしながら吸収のピーク画分のみを分取した。得られた13本のピーク画分のうち、アセトニトリル濃度が32%から40%の時点で溶出されたピーク画分の3本を、スピードバックによる濃縮後、さらにODSカラム (D E V E L O S I L 3000DS-HG-5; 野村化学(株)) を用い、先と同じ条件で分離及び精製を行った。

【0046】

各ピーク画分をスピードバックで濃縮・乾固させ、40%アセトニトリル30μlに溶解させ、アミノ酸シーケンサーに供した。その結果6本のペプチドのアミノ酸配列を判読することができた。以下に、各々のペプチドのアミノ酸配列を示す(アミノ末端からカルボキシル末端の方向に示す)。

【0047】

アミノ酸配列 (AT73) :

【化1】

Arg-Phe-Leu-Gly-Ile-Thr-Gly-Ser-Pro-Lys

【0048】

アミノ酸配列 (AT72) :

【化2】

Ile-His-Met-Asp-Ala-Phe-Ala-Lys

【0049】

アミノ酸配列 (AT741-1) :

【化3】

Gly-Val-Glu-Ile-Gly-Val-Ser-Leu-Pro-Lys

【0050】

アミノ酸配列 (AT741-2) ;

【化4】

Ala-Ser-Leu-Ser-Leu-Thr-Leu-Lys

【0051】

アミノ酸配列 (AT9) ;

【化5】

His-Tyr-Val-Pro-Leu-Ser-Gly-Asn-Leu-Leu-Met-Pro-Ile-Lys

【0052】

アミノ酸配列 (AT83) ;

【化6】

Val-Arg-Ala-Thr-Tyr-Val-Leu-Ser-Leu-Ala-Glu-Ile-Gln-Lys

【0053】

実施例3 リンドウアシル基転移酵素のcDNAクローニング

(1) cDNAライブラリーの作製

市販されているリンドウ (*Gentiana triflora* var. *japonica*) から花弁を集め、液体窒素中で乳鉢で磨碎した。この磨碎物から、グアニジンチオシアネート／塩化セシウムを用いる方法によりRNAを得、オリゴテックス（日本ロッシュ）を用い、製造者が推奨する方法にて、poly A+RNAを得た。グアニジンチオシアネート／塩化セシウムを用いる方法は、R. McGookin, Robert J. Slaterらの、Methods in Molecular Biology vol 2, (Human Press Inc. 1984) に詳細に示されている方法に従った。

【0054】

得られた poly A+RNAを鑄型とし、ストラタジーン (Stratagene) 社のZAP-cDNA合成キットを用いて2本鎖cDNAを合成し、ファージベクターλZAPIIへのクローニングを行った。更に、同社のGiga pack II Gold Packaging Extractキットを用いて、当該キットに記載された方法でcDNAライブラリーを作製した。

【0055】

(2) 合成DNAプライマーの設計

実施例2で得られた部分アミノ酸配列のうち、

【0056】

【化7】

Ile-His-Met-Asp-Ala-Phe-Ala-Lys

で示される配列は、リジルエンドペプチダーゼの特異性を考えると、

【0057】

【化8】

Lys-Ile-His-Met-Asp-Ala-Phe-Ala-Lys

であると考えられる。この配列の中の

【0058】

アミノ酸配列；

【化9】

Lys-Ile-His-Met-Asp-Ala-Phe-Ala

で示される部分を用いて、以下のオリゴヌクレオチドを合成した。

【0059】

ヌクレオチドの配列（オリゴ1）；

【化10】

5' -AARATMCAHATGGAYGCITTYGC-3'

【0060】

但し、特に記載のないかぎり、核酸の配列は I U P A C - I B U 準拠の核酸コード表に従って一文字で表記する。即ち、A：アデニン、C：シトシン、G：グアニン、T：チミン、Y：C又はT、R：A又はG、M：A又はC、H：A又はC又はT、及びIはイノシンを示す。

また、先に述べた c D N A ライブライマー作製時に使用したプライマーをもとに以下の他のオリゴヌクレオチドも合成した。

【0061】

ヌクレオチドの配列（オリゴ2）：

【化11】

5' -CTCGAGTTTTTTTTTTTTTT-3'

【0062】

(3) アシル基転移酵素遺伝子断片のクローニング

リンドウの花弁のRNAに由来する2本鎖DNA約0.1  $\mu$ gを鋳型にオリゴ1とオリゴ2をプライマーとして、PCR反応を行った。反応はポリメラーゼチエイン反応キットGene Amp（宝酒造（株））を用いて、95°C 1分、45°C 1分、72°C 2分を1サイクルとし、35サイクルを行い、得られた反応物を1%アガロース電気泳動したところ、約400 bpの特異的なDNA断片が観察された。このDNA断片を回収し、その10ngをDIG-ヌクレオチド混合液（ベーリンガー社）と合成ヌクレオチドIとIIを用いて、前述のPCR反応を25サイクルを行い、DIGで標識したDNA断片を得た。

【0063】

(4) アシル基転移酵素のcDNAのクローニング

上記のようにして得られた $\lambda$ ファージライブライマーを大腸菌XL1-Blue株（ストラタジーン社）に感染させ、1プレート当りブラーク5万個を含む5枚

のプレート（直径 13.5 cm）をスクリーニングした。

【0064】

ファージをフィルター（Hybond N+、アマーシャム社）に吸着させ、製造者の推奨する方法で処理した後、このフィルターをハイブリダイゼーションバッファー（5×SSC、50%ホルムアミド、50 mM リン酸ナトリウムバッファー（pH 7.0）、7% SDS、2% Blocking reagent（ベーリンガー社）、0.1%ラウロイルサルコシン、80 mg/ml サケ精子DNA）中で42°Cで1時間保持した。DIG標識した前述のDNA断片をハイブリダイゼーション液中に加え、さらに16時間のインキュベーションを行った。

【0065】

洗浄液（0.2×SSC、0.1% SDS）でフィルターを洗浄し、アルカリホスファターゼで標識されたDIG特異的な抗体による酵素免疫測定法（ベーリンガー・マンハイム株式会社）により5-ブロモ4-クロロ3-インドリルリン酸とニトロブルーテトラゾリウム塩の発色反応によって検出した。検出方法は製造者による使用説明書に従った。

【0066】

この結果、数十個の陽性クローニングが得られ、うち20クローニングをストラタジン社の推奨する方法で、cDNAをプラスミドpBluescript SK上に回収した。アガロースゲル電気泳動でcDNAの挿入を調べたところ、全てのクローニングにおいて各種サイズのcDNAの挿入が認められ、そのうち最長のものは1.7 kbであった。それらのうちから適当に9クローニング選び制限酵素による解析を行ったところ、サイズは異なるが全てのクローニングで同様の制限酵素パターンを示した。

【0067】

（5）塩基配列の決定

得られたクローニングからプラスミドを抽出し、ABI 373A・DNA シークエンサー（パーキンエルマー社）を用い、同社の推奨する蛍光試薬によるダイオキシ シークエンス法で、前述の9クローニングのうち全長を含むと考えられる6

つのクローン (pGAT2, pGAT3, pGAT4, pGAT7, pGAT8 及びpGAT11) についてcDNAの5'側の塩基配列を決定した。

【0068】

その結果、これらのクローンは互いに同じ塩基配列を持っており、cDNAの長さが異なるものと考えられた。これらのクローンのうちpGAT4の全塩基配列を決定した。塩基配列の決定は、Kilo-Sequence用 Deletion Kit (宝酒造(株)) を用いて、一連の欠失クローンを得た後、各々のクローン用いて上述の方法により行った。

【0069】

(6) 塩基配列とアミノ酸配列の比較

pGAT4に挿入されたcDNAは1703塩基でありその中に1410塩基(終止コドンを含む)からなるオープンリーディングフレーム(ORF)が見い出された。この配列を配列表・配列番号1に示す。実施例2で明らかになったアシル基転移酵素の部分アミノ酸配列の全てがORF中のアミノ配列として存在することから、クローニングされたcDNAは、リンドウ由来のアシル基転移酵素遺伝子であると結論した。開始コドンについては、アミノ末端の解析からグルタミン酸がアミノ末端の残基であると推測されたので、cDNAの塩基配列の上で、5'側から最初のATGが開始コドンであると推察した。

【0070】

一方、pGAT8に係るcDNAは、5'側がpGAT4よりも7塩基短いため、完全長のcDNAではないと考えられた。

【0071】

実施例4 大腸菌における遺伝子の発現

(1) 発現プラスミドの構築

大腸菌でのアシル基転移酵素遺伝子の発現には、大腸菌の発現ベクターであるpTrc99A(ファルマシア社)を用いた。このpTrc99Aはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)で誘導可能な大腸菌のtrcプロモーターを含み、その下流に目的遺伝子を挿入することにより、大腸菌での遺伝子発現が可能になる。

【0072】

また、制限酵素N c o I部位が開始コドンであるA T G配列を利用して導入されており、N c o I部位で組換えることにより、目的遺伝子の開始コドンからの直接発現が可能である。

【0073】

p G A T 4を当該ベクター内に存在する制限酵素部位E c o R IとK p n Iで消化して得られる約1. 8 k bのDNA断片（配列表・配列番号1記載の塩基配列を全て含む）を前述のp T r c 9 9 AのE c o R I、K p n I部位に組換えることにより、p G A T 1 0 1を構築した。

【0074】

アシル基転移酵素の開始コドン近傍にN c o I部位の導入を行うために、開始コドン近傍、及びアシル基転移酵素遺伝子内部（開始コドンから300塩基目付近）に対応する以下の2種類のオリゴヌクレオチドを合成した。

【0075】

オリゴヌクレオチド (G A T - N c o I) ;

【化12】

5' -TTCACCATGGAGCAAATCCAAATGGT-3'

【0076】

オリゴヌクレオチド (G A T - S c a I) ;

【化13】

5' -CGAGTCGCCCTCATCAC-3'

【0077】

10ngのp G A T 4を鑄型とし、上記のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてP C R反応を行った。反応はポリメラーゼチエイン反応キットG e n e A m p（宝酒造（株））を用いて、95℃1分、56℃1分、72℃2分を1サイクルとし、15サイクルを行い、得られた反応物を1%アガロース電気泳動したところ、約300bpの特異的なDNA断片が観察された。このDNA断片を回収

し、制限酵素Nco IとAat Iで切断後、pGAT101をNco IとAat Iで切断して得られる約6 kbの断片と連結することにより、pGAT102を構築した。PCR法により増幅した部分の塩基配列はpGAT102構築後にpGAT4と同じであることを確認した。

## 【0078】

## (2) アシル基転移酵素遺伝子の大腸菌での発現

pGAT102で大腸菌MM294 (supE44 hsdR endA1 pro thi) (Meselson and Yuan, Nature, 217, 1110-, 1968) を形質転換した。なお、ここで形質転換される宿主は、形質転換用の宿主として利用可能な大腸菌であれば特に特定されるものではなく、遺伝子組換えに一般に用いられ、当業者が容易に入手できるその他の株（例えば、JM109やDH5等）を利用することができます。また、大腸菌の形質転換方法はHanahanの方法に従った (J. Mol. Biol., 166, 557-, 1983)。形質転換された大腸菌をアンピシリン (50 μg/ml) を含む2 mlのLB培地 (トリプトン 10 g、酵母エキス 5 g、塩化ナトリウム 10 gを1リッターの蒸留水に溶かし、水酸化ナトリウムでpHを7.2に調整する) に植菌し、37°Cで一晩培養した。

## 【0079】

この培養液1 mlを10 mlのM9培地 (リン酸一水素ナトリウム 0.6%、リン酸二水素カリウム 0.3%、塩化ナトリウム 0.5%、塩化アンモニウム 0.1%、グルコース 0.5%、硫酸マグネシウム 1 mM、ビタミンB1 4 μg/ml、pH 7.2) にカザミノ酸0.5%とアンピシリン50 μg/mlを加えた培地に接種し、37°Cで3時間培養後、0.5 MのIPTGを40 μl添加 (終濃度2 mM) し、更に5時間培養を続けた。集菌後、30 mM塩化ナトリウムを含む30 mMトリス塩酸バッファー (pH 7.5) で洗浄し、洗浄菌体を同じバッファー1 mlに懸濁した。1 mgリゾチーム、0.25 M EDTAを25 ml加えて30分間0°Cに放置した後、凍結・融解を3回繰り返して菌体を破壊した。

## 【0080】

これを15000 rpm、30分間遠心をして得た上清を粗酵素液とし、実施例1(3)で示した酵素活性測定法により酵素活性を測定した。マイクロタイタープレート法により、pGAT102を導入した大腸菌ではアシル基転移反応が確認されたので、HPLCによる分析を行った。

## 【0081】

その結果、pGAT102を導入した大腸菌では24 nmolのデルフィニジン3、5-ジグルコシドと21.5 nmolのカフェオイル-CoAから18.3 nmolのデルフィニジン3-グルコシル5-カフェオイルグルコシドの生成が認められた。この結果と、リンドウのアントシアニンにおいては5位と3'位のグルコースにアシル基が結合しているという既知の事実と併せて考えると、pGAT4がコードするアシル基転移酵素はアントシアニジン3、5-ジグルコシドの5位のグルコースにアシル基を転移する反応を触媒することが判った。

また、大腸菌で生産されたアシル基転移酵素によりアシル化されたデルフィニジン3、5-ジグルコシドも、リンドウから精製して得られたアシル基転移酵素によりアシル化されたものと同様に室温で長期間放置しても安定な発色を示した。

## 【0082】

実施例5 酵母における遺伝子の発現

## (1) 酵母の発現ベクター

酵母の発現ベクターpYGA2269 (Ashikari et al, Appl. Microbiol. Biotechnol. 30, 515-520, 1989、特開昭62-158481参照) をEcoRIとBglIIで消化して得られる約8kbのDNA断片と、M13mp18(例えば、宝酒造(株))をEcoRIとBglIIで消化して得られる約0.6kbのDNA断片を連結して得られるプラスミドをpYGA22mとした。pYGA22mをSalIで消化したのちに得られる約8kbのDNA断片を自己連結(セルフライゲーション)してプラスミドpYE22mを構築した。

## 【0083】

## (2) アシル基転移酵素の酵母での発現

pGAT4又はpGAT8を当該各ベクター内に存在する制限酵素部位EcoRIとKpnIで消化して得られる約1.8kbのDNA断片とpYE22mを同じくEcoRIとKpnIで消化して得られる約8kbのDNA断片を連結して酵母発現プラスミドpYGAT4とpYGAT8を各々構築した。pYGTA4は第1番目のメチオニンからの翻訳を行うが、pYGAT8では分離したcDNAの5'側の一部が欠けているため、アシル基転移酵素の翻訳開始メチオニン（配列表・配列番号1におけるアミノ酸配列番号；-1）ではなく、次のメチオニン（配列表・配列番号1におけるアミノ酸配列番号；5）からの翻訳が行われる。

## 【0084】

これらの酵母発現プラスミドでは、アシル基転移酵素をコードしているcDNAは酵母の構成的なプロモーターのひとつであるグリセロアルデヒド-3リン酸脱水素酵素のプロモーターの下流に連結されており、同プロモーターにより転写が制御されている。

## 【0085】

伊藤らの方法 (Ito et al. J. Bacteriol., 153, 163-168, 1983) を用いpYGAT4及びpYGAT8で、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* G1315 (Ashikari et al. Appl. Microbiol. Biotechnol. 30, 515-520, 1989) を形質転換した。形質転換された酵母はトリプトファンの合成能の回復により選択した。

なお、ここで形質転換に用いる酵母の宿主は特に限定されるものではなく、TRP1遺伝子が不完全なためにトリプトファンの要求性を示す株であれば何れのものでも用いることができる（例えば、イースト・ジェネティク・ストック・センターより購入可能 (Yeast Genetic Stock Center; Berkeley, CA, USA; カタログ第7版 (1991年) 第36頁)）。

## 【0086】

得られた形質転換株を10mlの1%カザミノ酸 (Difco社) を含むバー

クホルダー培地 (Burkholder, Amer. J. Bot. 30, 206-210) にて、30°Cで40時間振盪培養した。併せて、対照実験のために、トリプトファンの合成能を自然に回復した酵母も同様に培養した。

## 【0087】

これらを集菌後、同量の菌体破碎用バッファー (30 mM トリス塩酸 pH 7.5, 30 mM 塩化ナトリウム) で洗浄し、さらに1 mlの同じバッファーにサスPENDし、1.5 mlのエッペンドルフチューブに移した。遠心分離後、上清を除き0.4 mlの同じバッファーで沈殿菌体を再度サスPENDし、400 mgのグラスピーツ (Glass Beads 425-600 microns Acid-Wash、シグマ社) を加えて激しく振盪することにより、酵母菌体を破碎した。

## 【0088】

遠心分離後の上清を粗酵素液とし実施例1(3)で示した酵素活性測定法により酵素活性を測定した。マイクロタイタープレート法により、pY GAT 4 及び pY GAT 8 を導入した酵母は何れもアシル基転移反応が確認されたので、HPLCによる分析を行った。なお、対照に用いた酵母ではアシル基転移活性は認められなかった。

## 【0089】

その結果、pY GAT 4 及び pY GAT 8 を導入した酵母では24 nmolのデルフィニジン3、5-ジグルコシドと21.5 nmolのカフェオイル-CoAから各々16.6 nmolと20.9 nmolのデルフィニジン3-グルコシル5-カフェオイルグルコシドの生成が認められた。pY GAT 4 と pY GAT 8 から生産される蛋白質はそのアミノ末端が異なるが、ともにアシル基転移酵素活性を保持していた。

また酵母で生産されたアシル基転移酵素によりアシル化されたデルフィニジン3、5-ジグルコシドも、リンドウから精製して得られたアシル基転移酵素によりアシル化されたものと同様に室温で長期間放置しても安定な発色を示した。

## 【0090】

実施例6 アシル基転移酵素(2)のクローニング

実施例3(6)に記載のpGAT4、即ち配列表・配列番号1記載のDNAを有するpGAT4を、制限酵素EcoRIとNdeIで消化して得られるDNA断片のうち、アシル基転移酵素の翻訳領域を含むDNA断片2つをまとめて回収し、前述の方法でDIG標識した。これをプローブとして実施例3(4)に記載したリンドウの花弁のcDNAライブラリーのファージを吸着させたフィルター(Hybond N+、アマーシャム社)を、製造者(アマーシャム社)が推奨する方法でフィルターに結合した色素及びDIG標識を除去して再生した後、低濃度ホルムアミドハイブリダイゼーションバッファー(5×SSC、30%ホルムアミド、50mM Tris-HCl、pH 7.5、1%SDS)中で42度で16時間ハイブリダイズした。

## 【0091】

洗浄液(5×SSC、0.1%SDS)中で50度で洗浄し、実施例3(4)に記載したように発色させた。数十のクローンが発色したが、発色したクローンのうちで、実施例3(4)では発色しなかったクローンを12個得た。これらのクローンのcDNAの塩基配列を先に述べたような方法で、5'側から決定したところ、11クローンはpGAT4の塩基配列と一致したが、1クローンは一致しなかった。これをpGAT106とした。

## 【0092】

pGAT106の全塩基配列を先に述べたようにして決定した。pGAT106に挿入されたcDNAは1622塩基でありその中に1440塩基(終止コドンを含む)からなるORFが見い出された。これを配列表・配列番号2に示す。配列番号2が含むORFについて、pGAT4がコードするアミノ酸配列と全領域にわたって、相同性を調べた。そのホモロジーは、38%であった。

## 【0093】

pGAT106のコードするアミノ酸配列は、アシル基転移酵素であるpGAT4のコードしている酵素と相同であるため、同様な酵素活性、つまりアントシアニンにアシル基転移を触媒する活性を持っていると推測される。リンドウのアントシアニンは、5位と3'位のグルコースにアシル基が結合しているので、pGAT106がアントシアニンの3'位のグルコースにアシル基を転移する酵素

反応を触媒することを示唆する。また、この結果はアシル基転移酵素は、アシル基を転移するアントシアニンの糖の位置は異なっていても、アミノ酸配列及びそれをコードしている塩基配列は相同であることを示している。先に述べたようにアシル基を有するアントシアニンは多数存在し、これら化合物のアシル基の数や位置は多様性に富み、アシル基の転移反応を触媒する酵素も多数あることが推測されるが、それらの酵素のアミノ酸配列は、ここで得られた p G A T 4 及び p G A T 1 0 6 のアミノ酸配列と相同性がみられるることは容易に類推でき、これに基づき、他のアシル基転移酵素遺伝子を得ることができる。

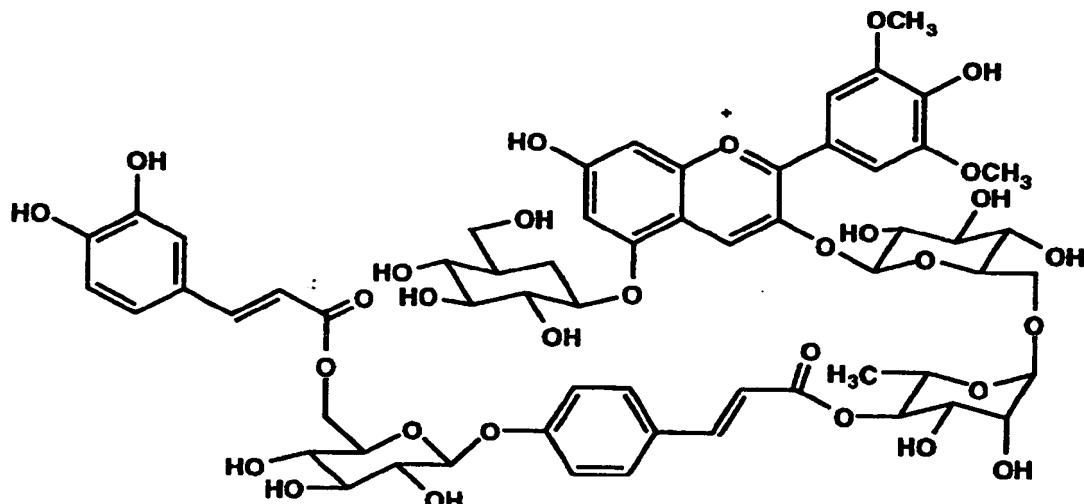
## 【0094】

実施例 7 ペチュニアのアントシアニン

ペチュニア (Petunia hybrida) 品種サフィニアパープル (サントリー (株)) の花色が通常の赤紫から紫に変異した変異株 (VM) のアントシアニンをその花弁を液体窒素中で粉碎し、50%アセトニトリル、0.1%TFA 水溶液で抽出した。濾過後、濾過を ODS、ODP の逆相カラムクロマトグラフィーで分離、精製した。そのうちの一つの化合物の構造を FABMS、<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR を用いて、詳細に解析したところ、新規なアントシアニンを見いだした。その構造を以下に示す。

## 【0095】

## 【化14】



## 【0096】

即ち、この構造は  $3-O-(6-O-(4-O-(4-O-(6-O-\text{カフェオイル}-\beta-D-\text{グルコピラノシル})-\text{クマロイル})-\alpha-L-\text{ラムノシル})-\beta-D-\text{グルコピラノシル})-5-O-\beta-D-\text{グルコピラノシル}-\text{マルビジン}$  であり、アシル基が2つ結合したアントシアニンであった。

## 【0097】

また、 $3-O-(6-O-(4-O-(4-O-(6-O-\text{クマロイル}-\beta-D-\text{グルコピラノシル})-\text{クマロイル})-\alpha-L-\text{ラムノシル})-\beta-D-\text{グルコピラノシル})-5-O-\beta-D-\text{グルコピラノシル}-\text{マルビジン}$ 、 $3-O-(6-O-(4-O-(4-O-(6-O-\text{カフェオイル}-\beta-D-\text{グルコピラノシル})-\text{カフェオイル})-\alpha-L-\text{ラムノシル})-\beta-D-\text{グルコピラノシル})-5-O-\beta-D-\text{グルコピラノシル}-\text{マルビジン}$ 、 $3-O-(6-O-(4-O-(4-O-(6-O-\text{クマロイル}-\beta-D-\text{グルコピラノシル})-\text{カフェオイル})-\alpha-L-\text{ラムノシル})-\beta-D-\text{グルコピラノシル})-5-O-\beta-D-\text{グルコピラノシル}-\text{マルビジン}$ も検出された。このアントシアニンは、VMの花弁のみならず、フルコンブルー（サカタのタネ（株））、Old Glory Blue（Ball Seeds）などの濃い紫色の花弁にも存在していることがわかった。即ち、アシル基を2つ持つアントシアニンはペチュニアの濃い紫色に寄与していると思われる。

## 【0098】

従って、ペチュニア由来のアントシアニンに関するアシル基転移酵素には、アントシアニンの3位のルチノシドにクマル酸又はカフェ酸を転移する反応を触媒する酵素と、モノアシルマルビジンにグルコースを介してクマル酸又はカフェ酸を転移する反応を触媒する酵素の2種類があることを示唆する。

## 【0099】

## 【発明の効果】

以上のように、本発明においてはリンドウ由来の芳香族アシル基転移酵素の精製、当該酵素のcDNAのクローニング及び当該cDNAの塩基配列の決定を行った。また、大腸菌と酵母での活性発現を行うことにより、分離したcDNAが

芳香族アシル基転移酵素をコードするものであることを確認した。

従って、本発明に係るcDNAを適当な植物発現ベクターに接続し、植物に導入することにより、アシル化反応を植物の花色調節に利用することが可能となった。

また、本酵素活性を利用することにより、植物の中あるいは試験管内でアントシアンの構造を改変し、より安定なアントシアンを提供することができる。

【0100】

【配列表】

配列番号 (SEQ ID NO) : 1

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 1703

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数 (STRANDEDNESS) : 二本鎖 (double)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : cDNA to mRNA

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

アンチセンス (ANTI-SENSE) : No

起源 (ORIGINAL SOURCE)

生物名 (ORGANISM) : リンドウ (Gentiana triflora var. japonica)

組織の種類 (TISSUE TYPE) : 花弁 (petal)

直接の起源 (IMMEDIATE SOURCE)

ライブラリー名 (LIBRARY) : cDNA library

クローン名 (CLONE) : pGAT4

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

TCATT ATG GAG CAA ATC CAA ATG GTG AAG GTT CTT GAA AAA TGC 44

Met Glu Gln Ile Gln Met Val Lys Val Leu Glu Lys Cys

-1 1 5 10

CAA GTT ACA CCA CCA TCT GAC ACA ACA GAT GTC GAG TTA TCG CTA 89

Gln Val Thr Pro Pro Ser Asp Thr Thr Asp Val Glu Leu Ser Leu

15 20 25

CCG GTA ACA TTC TTC GAT ATC CCC TGG TTG CAC TTG AAT AAG ATG 134

Pro Val Thr Phe Phe Asp Ile Pro Trp Leu His Leu Asn Lys Met

30 35 40

CAG TCC CTT CTG TTT TAC GAC TTT CCG TAC CCA AGA ACA CAT TTC	179
Gln Ser Leu Leu Phe Tyr Asp Phe Pro Tyr Pro Arg Thr His Phe	
45 50 55	
TTG GAC ACT GTT ATC CCT AAT CTT AAG GCC TCT TTG TCT CTC ACT	224
Leu Asp Thr Val Ile Pro Asn Leu Lys Ala Ser Leu Ser Leu Thr	
60 65 70	
CTA AAA CAC TAC GTT CCG CTT AGC GGA AAT TTG TTG ATG CCG ATC	269
Leu Lys His Tyr Val Pro Leu Ser Gly Asn Leu Leu Met Pro Ile	
75 80 85	
AAA TCG GGC GAA ATG CCG AAG TTT CAG TAC TCC CGT GAT GAG GGC	314
Lys Ser Gly Glu Met Pro Lys Phe Gln Tyr Ser Arg Asp Glu Gly	
90 95 100	
GAC TCG ATA ACT TTG ATC GTT GCG GAG TCT GAC CAG GAT TTT GAC	359
Asp Ser Ile Thr Leu Ile Val Ala Glu Ser Asp Gln Asp Phe Asp	
105 110 115	
TAC CTT AAA GGT CAT CAA CTG GTC GAT TCC AAT GAT TTG CAT GGC	404
Tyr Leu Lys Gly His Gln Leu Val Asp Ser Asn Asp Leu His Gly	
120 125 130	
CTT TTT TAT GTT ATG CCA CGG GTT ATA AGG ACC ATG CAA GAC TAT	449
Leu Phe Tyr Val Met Pro Arg Val Ile Arg Thr Met Gln Asp Tyr	
135 140 145	
AAA GTG ATC CCG CTC GTC GCC GTG CAA GTC ACC GTT TTT CCT AAC	494
Lys Val Ile Pro Leu Val Ala Val Gln Val Thr Val Phe Pro Asn	
150 155 160	
CGT GGC ATA GCC GTG GCT CTG ACC GCA CAT CAT TCA ATT GCA GAT	539
Arg Gly Ile Ala Val Ala Leu Thr Ala His His Ser Ile Ala Asp	
165 170 175	

GCT AAA ACT TTT GTC ATG TTC ATC AAT GCT TGG GCC TAT ATT AAC	584	
Ala Lys Ser Phe Val Met Phe Ile Asn Ala Trp Ala Tyr Ile Asn		
180	185	190
AAA TTT GGG AAA GAC GCG GAC TTG TTG TCC GCG AAT CTT CTT CCA	629	
Lys Phe Gly Lys Asp Ala Asp Leu Leu Ser Ala Asn Leu Leu Pro		
195	200	205
TCT TTC GAT AGA TCG ATA ATC AAA GAT CTG TAT CGC CTA CAG CAA	674	
Ser Phe Asp Arg Ser Ile Ile Lys Asp Leu Tyr Gly Leu Glu Glu		
210	215	220
ACA TTT TGG AAC GAA ATG CAA GAT GTT CTT GAA ATG TTC TCT AGA	719	
Thr Phe Trp Asn Glu Met Gln Asp Val Leu Glu Met Phe Ser Arg		
225	230	235
TTT CGA AGC AAA CCC CCT CGA TTC AAC AAG GTC CGA GCT ACA TAT	764	
Phe Gly Ser Lys Pro Pro Arg Phe Asn Lys Val Arg Ala Thr Tyr		
240	245	250
GTC CTC TCC CTT GCT GAA ATC CAG AAG CTA AAG AAC AAA GTC CTG	809	
Val Leu Ser Leu Ala Glu Ile Gln Lys Leu Lys Asn Lys Val Leu		
255	260	265
AAT CTC AGA GGA TCC GAA CCG ACA ATA CGT GTC ACG ACG TTC ACA	854	
Asn Leu Arg Gly Ser Glu Pro Thr Ile Arg Val Thr Phe Thr		
270	275	280
ATG ACG TGT GGA TAC GTC TGG ACA TGC ATG GTC AAA TCA AAA GAT	899	
Met Thr Cys Gly Tyr Val Trp Thr Cys Met Val Lys Ser Lys Asp		
285	290	295
GAC GTC GTC TCA GAG GAA TCA TCG AAC GAC GAA AAT GAG CTC GAG	944	
Asp Val Val Ser Glu Glu Ser Ser Asn Asp Glu Asn Glu Leu Glu		
300	305	310

TAC	TTC	AGT	TTT	ACA	GCG	GAT	TGC	CGA	CGA	CTT	CTG	ACG	CCC	CCG	989
Tyr	Phe	Ser	Phe	Thr	Ala	Asp	Cys	Arg	Gly	Leu	Leu	Thr	Pro	Pro	
315												320		325	
TGT	CCG	CCT	AAC	TAC	TTT	GGC	AAC	TGT	CTT	GCG	TCA	TGC	GTT	GCA	1034
Cys	Pro	Pro	Asn	Tyr	Phe	Gly	Asn	Cys	Leu	Ala	Ser	Cys	Val	Ala	
330												335		340	
AAA	GCA	ACA	CAT	AAA	GAG	TTA	GTT	GGG	GAT	AAA	GGG	CTT	CTT	GTT	1079
Lys	Ala	Thr	His	Lys	Glu	Leu	Val	Gly	Asp	Lys	Gly	Leu	Leu	Val	
345												350		355	
GCA	GTT	GCA	GCT	ATT	GGA	GAA	GCC	ATT	GAA	AAG	AGG	TTG	CAC	AAC	1124
Ala	Val	Ala	Ala	Ile	Gly	Glu	Ala	Ile	Glu	Lys	Arg	Leu	His	Asn	
360												365		370	
GAA	AAA	GCC	GTT	CTT	GCA	GAT	GCA	AAA	ACT	TCG	TTA	TCG	CAA	TCT	1169
Glu	Lys	Gly	Val	Leu	Ala	Asp	Ala	Lys	Thr	Trp	Leu	Ser	Glu	Ser	
375												380		385	
AAT	GGA	ATC	CCT	TCA	AAA	ACA	TTT	CTC	GGG	ATT	ACC	GGA	TCG	CCT	1214
Asn	Gly	Ile	Pro	Ser	Lys	Arg	Phe	Leu	Gly	Ile	Thr	Gly	Ser	Pro	
390												395		400	
AAG	TTC	GAT	TCG	TAT	GGT	GTA	GAT	TTT	GGA	TCG	CGA	AAG	CCT	GCA	1259
Lys	Phe	Asp	Ser	Tyr	Gly	Val	Asp	Phe	Gly	Trp	Gly	Lys	Pro	Ala	
405												410		415	
AAA	TTT	GAC	ATT	ACC	TCT	GTT	GAT	TAT	GCA	GAA	TTG	ATT	TAT	GTG	1304
Lys	Phe	Asp	Ile	Thr	Ser	Val	Asp	Tyr	Ala	Glu	Leu	Ile	Tyr	Val	
420												425		430	
ATT	CAG	TCC	AGG	GAT	TTT	GAA	AAA	GGT	GTG	GAG	ATT	GGA	GTA	TCA	1349
Ile	Gln	Ser	Arg	Asp	Phe	Glu	Lys	Gly	Val	Glu	Ile	Gly	Val	Ser	
435												440		445	

TTG CCT AAG ATT CAT ATG GAT GCA TTT GCA AAA ATC TTT GAA GAA	1394	
Leu Pro Lys Ile His Met Asp Ala Phe Ala Lys Ile Phe Glu Glu		
450	455	460
GGC TTT TGC TCT TTG TCA TAGTCTCTTT AATAGAACCA TATTTGCTGC	1442	
Gly Phe Cys Ser Leu Ser		
465		
AATAAAAGTAC CAAGTCCTTT AGTAACACTA CACCAAACCC TACTTCGAG GCGGGAACAC	1502	
CACAAACGAGG TTCAATCACT AGAAGGTTGT ACTTCATAAA TTCCAGAGGT CGAATATACA	1562	
CCGTTGTCCT CTGAAAAGTT GAACCTCACA CCTGACATGG TGTTACGATA GGTATTGTAT	1622	
AATGCCATTA TATACTTCCA TAAAGTATCC TATGCAATAG AGAACATGTT ATGTGTAAA	1682	
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA A	1703	

## 【0101】

配列番号 (SEQ ID NO) : 2

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 1622

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数 (STRANDEDNESS) : 二本鎖 (double)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : cDNA to mRNA

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

アンチセンス (ANTI-SENSE) : No

起源 (ORIGINAL SOURCE)

生物名 (ORGANISM) : リンドウ (Gentiana triflora var. japonica)

組織の種類 (TISSUE TYPE) : 花弁 (petal)

直接の起源 (IMMEDIATE SOURCE)

ライブラリー名 (LIBRARY) : cDNA library

クローン名 (CLONE) : pGAT106

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

GAACCATTGA ATCCAATTAA TCTGATTAT TAAG ATG GCA GGA AAT TCC GAG	52
Met Ala Gly Asn Ser Glu	
-1 1 5	
GAT ATC AAA GTT CTT GAG AAA TGC CGT GTT GCG CCA CCA CCG GAC	97
Asp Ile Lys Val Leu Glu Lys Cys Arg Val Ala Pro Pro Pro Asp	
10 15 20	
GCC GTC GCC GAG TTT ACA GTC CCA CTG TCG TTT TTC GAC ATG CGA	142
Ala Val Ala Glu Phe Thr Val Pro Leu Ser Phe Phe Asp Met Arg	
25 30 35	
TGG TTG ATC TCT GAT GCA GAA CAC CAT CTG CAT TTC TAC AGA TTC	187
Trp Leu Ile Ser Asp Ala Glu His His Leu His Phe Tyr Arg Phe	
40 45 50	
CGC CAT CCT TGT CCC AAC TCT AAA TTT ATC ATT TCA TCC ATT AAA	232
Arg His Pro Cys Pro Asn Ser Lys Phe Ile Ile Ser Ser Ile Lys	
55 60 65	
TCG TCC CTT TCC CTT GTT CTC AAA CAC TTT CTT CCG TTA GCC GGG	277
Ser Ser Leu Ser Leu Val Leu Lys His Phe Leu Pro Leu Ala Gly	
70 75 80	
AAT TTG ATT TGG CCG GTA GAT TCC TCC GAT AGA ATG CCG CAG TTG	322
Asn Leu Ile Trp Pro Val Asp Ser Ser Asp Arg Met Pro Glu Leu	
85 90 95	
CGT TAC AAG AAA GGG GAC TCC GTT TCT TTA ACA ATT GCA GAA TCG	367
Arg Tyr Lys Lys Gly Asp Ser Val Ser Leu Thr Ile Ala Glu Ser	
100 105 110	
AGC ATG GAT TTT GAT TAT CTC GCC GGA GAT CAT CAG AGG GAT TCT	412
Ser Met Asp Phe Asp Tyr Leu Ala Gly Asp His Gin Arg Asp Ser	
115 120 125	

TAT AAA TTC AAC GAT TTG ATT CCG CAG CTG CCA GAA CCG ATT GTA	457	
Tyr Lys Phe Asn Asp Leu Ile Pro Gln Leu Pro Glu Pro Ile Val		
130	135	140
ACC TCC GGC GAC GAA GCA TTA CCA CTT TTT GCT TTA CAG GTG ACG	502	
Thr Ser Gly Asp Glu Val Leu Pro Leu Phe Ala Leu Gln Val Thr		
145	150	155
GTG TTC TCC AAC ACC GGT ATA TGC ATT GGA CGC AAT CTT CAT CAA	547	
Val Phe Ser Asn Thr Gly Ile Cys Ile Gly Arg Asn Leu His Gln		
160	165	170
GTT CTT GGT GAT GCC AGT TCT TTT CTG CAT TTT AAT AAA TTA TGG	592	
Val Leu Gly Asp Ala Ser Ser Phe Leu His Phe Asn Lys Leu Trp		
175	180	185
CTT TTG GTT GAC AAA TCC AAT GGA GAT TCA TTA AAG TTC CTT CCA	637	
Val Leu Val Asp Lys Ser Asn Gly Asp Ser Leu Lys Phe Leu Pro		
190	195	200
CTT TCT TCT CTA CCT ATG TAC GAC AGA TCT GTG GTG CAA GAT CCA	682	
Leu Ser Ser Leu Pro Met Tyr Asp Arg Ser Val Val Gln Asp Pro		
205	210	215
TTT CAT ATT CGT CGA AAA ATC TAC AAT GAA AGA AAA CTG CTC AAA	727	
Phe His Ile Arg Arg Lys Leu Tyr Asn Glu Arg Lys Leu Leu Lys		
220	225	230
TCT CAG GGC ACA CCT ACT GTT CTA AAT CCA GCA ATT TCT AAA GAT	772	
Ser Gln Gly Thr Pro Thr Val Leu Asn Pro Ala Ile Ser Lys Asp		
235	240	245
GAA GTT CGA GCC ACC TTC ATC CTA CAC CCT ATT GAT ATC ATG AAG	817	
Glu Val Arg Ala Thr Phe Ile Leu His Pro Ile Asp Ile Met Lys		
250	255	260

CTC AAG AAA TTC ATT TCG TCA AAA AAT CGC AAC TTA ACC GGT ACT	862	
Leu Lys Lys Phe Ile Ser Ser Lys Asn Arg Asn Leu Thr Gly Ser		
265	270	275
AGT AAT TAT AAT CTG TCA ACT TTC ACG GTG ACA TCT GCA CTG ATC	907	
Ser Asn Tyr Asn Leu Ser Thr Phe Thr Val Thr Ser Ala Leu Ile		
280	285	290
TGG ACA TGC TTG TCG AAA TCA TTA GAC ACC GTC GTA AGA GAG AAG	952	
Trp Thr Cys Leu Ser Lys Ser Leu Asp Thr Val Val Arg Glu Lys		
295	300	305
GTG GAA GAG GAT AAA CAT GCA GCA AAC TTA TGT GCT TTC ATC AAC	997	
Val Glu Glu Asp Lys His Ala Ala Asn Leu Cys Ala Phe Ile Asn		
310	315	320
TGC CGA CAA CGT TTT GCT CGG CCC ATA CCT CAA AAT TAC TTT GGA	1042	
Cys Arg Gln Arg Phe Ala Pro Pro Ile Pro Gln Asn Tyr Phe Gly		
325	330	335
AAT TGC ATA GTG CCT TGT ATG GTG GGA TCG ACT CAT GAG CAA CTT	1087	
Asn Cys Ile Val Pro Cys Met Val Gly Ser Thr His Glu Gln Leu		
340	345	350
GTA GGA AAT GAA GGG TTG TCG GTA GCT GCA ACC GCC ATC GGA CAT	1132	
Val Gly Asn Glu Gly Leu Ser Val Ala Ala Thr Ala Ile Gly Asp		
355	360	365
GCT ATC CAT AAG AGG TTA CAT GAC TAC GAA GGA ATT CTG AGA GGA	1177	
Ala Ile His Lys Arg Leu His Asp Tyr Glu Gly Ile Leu Arg Gly		
370	375	380
GAT TGG ATA TCG CCC CGA TCA ACA TCT GCG GCA CCA AGG TCG	1222	
Asp Trp Ile Ser Pro Pro Arg Ser Thr Ser Ala Ala Pro Arg Ser		
385	390	395

ACG CTC ATT TAT GTC	CTT GGA TCC GCA CAA CGC AAT GTG CAT GAT	1267
Thr Leu Ile Tyr Val Val Gly Ser Ala Gln Arg Asn Val His Asp		
400	405	410
TTT GAT GCA GAT TTT CGT TGG GGA AAG CTT GAA AAG CAT GAA TCT		1312
Phe Asp Ala Asp Phe Gly Trp Gly Lys Leu Glu Lys His Glu Ser		
415	420	425
GTT TCA ACT AAT CCT TCG GCA ACA CTA ATT TTG ATC TCT CGG TCC		1357
Val Ser Thr Asp Pro Ser Ala Thr Leu Ile Leu Ile Ser Arg Ser		
430	435	440
AGA AGA TTT AAA GGA GCA CTT GAG CTT GGC ATT TCT TTG CCT AAG		1402
Arg Arg Phe Lys Gly Ala Leu Glu Leu Gly Ile Ser Leu Pro Lys		
445	450	455
AAT AGG ATG GAC GCA TTT GCC ACC ATT TTT ACG AAT TTC ATC AAT		1447
Asn Arg Met Asp Ala Phe Ala Thr Ile Phe Thr Asn Phe Ile Asn		
460	465	470
AGT CTC CAT GTG AGC AGC CCT TTG TAAGAAAAAA GTGGTATCAA		1491
Ser Leu His Val Arg Ser Pro Leu		
475		
TGTATAAAAA AGACAGACAA GTTATGATGC AACAAATGTT TTAGGAGATT ACAAAATCCAT		1551
GGGAACATGT ATCAAACCTCA TCTCTCTATA TATATATATT CAATTGTTTT AAAAAAAA		1611
AAAAAAA A		1622

【書類名】 要約書

【要約】

【目的】 芳香族アシル基転移酵素をコードする遺伝子及びその利用を提供する

【構成】 リンドウ (*Gentiana triflora* var. *japonica*) の花弁からアシル基転移酵素を精製してそのアミノ酸配列の一次構造を決定し、当該アミノ酸配列の情報に基づき、遺伝子組換え技術を用いてリンドウ由来のアシル基転移酵素に係る cDNA を単離した後、構造遺伝子の塩基配列を決定することにより目的のアシル基転移酵素をコードする遺伝子を得た。

【効果】 本発明に係るアシル基転移酵素をコードする遺伝子を用いてアントシアノン系色素をアシル化することにより花色を変化させることができ、アントシアノンの安定性を増すことができる。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

〈認定情報・付加情報〉

【特許出願人】 申請人  
【識別番号】 000001904  
【住所又は居所】 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号  
【氏名又は名称】 サントリー株式会社

出願人履歴情報

識別番号 [000001904]

1. 変更年月日 1990年 8月13日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号  
氏 名 サントリー株式会社

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**